



11-14-08

IBJ

PTO/SB/21 (08-08)

Approved for use through 09/30/2008. OMB 0651-0031

U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

**TRANSMITTAL
FORM**

(to be used for all correspondence after initial filing)

Total Number of Pages in This Submission 18

Application Number	10/761,717
Filing Date	January 20, 2004
First Named Inventor	Yukun Sun
Art Unit	1656
Examiner Name	Samuel W. Liu
Attorney Docket Number	57783.8004.US00

ENCLOSURES (Check all that apply)

<input type="checkbox"/> Fee Transmittal Form	<input type="checkbox"/> Drawing(s)	<input type="checkbox"/> After Allowance Communication to TC
<input type="checkbox"/> Fee Attached	<input type="checkbox"/> Licensing-related Papers	<input type="checkbox"/> Appeal Communication to Board of Appeals and Interferences
<input type="checkbox"/> Amendment/Reply	<input type="checkbox"/> Petition	<input type="checkbox"/> Appeal Communication to TC (Appeal Notice, Brief, Reply Brief)
<input type="checkbox"/> After Final	<input type="checkbox"/> Petition to Convert to a Provisional Application	<input type="checkbox"/> Proprietary Information
<input type="checkbox"/> Affidavits/declaration(s)	<input type="checkbox"/> Power of Attorney, Revocation	<input type="checkbox"/> Status Letter
<input type="checkbox"/> Extension of Time Request	<input type="checkbox"/> Change of Correspondence Address	<input checked="" type="checkbox"/> Other Enclosure(s) (please identify below):
<input type="checkbox"/> Express Abandonment Request	<input type="checkbox"/> Terminal Disclaimer	return postcard
<input type="checkbox"/> Information Disclosure Statement	<input type="checkbox"/> Request for Refund	
<input checked="" type="checkbox"/> Certified Copy of Priority Document(s)	<input type="checkbox"/> CD, Number of CD(s) _____	
<input type="checkbox"/> Reply to Missing Parts/Incomplete Application	<input type="checkbox"/> Landscape Table on CD	
<input type="checkbox"/> Reply to Missing Parts under 37 CFR 1.52 or 1.53		

Remarks

A certified copy of Chinese priority application number 01126278.8 filed July 19, 2001 is enclosed as requested in the Final Office Action dated September 15, 2008.

SIGNATURE OF APPLICANT, ATTORNEY, OR AGENT

Firm Name	Perkins Coie LLP		
Signature			
Printed name	Lauren Sliger		
Date	November 12, 2008	Reg. No.	51,086

CERTIFICATE OF TRANSMISSION/MAILING

I hereby certify that this correspondence is being facsimile transmitted to the USPTO or deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 on the date shown below:

Signature			
Typed or printed name	Colleen Kirchner	Date	November 12, 2008

This collection of information is required by 37 CFR 1.5. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.11 and 1.14. This collection is estimated to 2 hours to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

If you need assistance in completing the form, call 1-800-PTO-9199 and select option 2.

中华人民共和国国家知识产权局
STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA



证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

请 日： 2001.07.19

请 号： 01126278.8

请 类 别： 发明专利

发明创造名称： 生产促胰岛素分泌肽 GLP-1 (7-36) 的基因
工程菌以及生产 GLP-1 (7-36) 的方法

请 人： 上海华谊生物技术有限公司

人或设计人： 孙玉昆、伍登熙、巫爱珍、朱志勇、余刚、
周加祥、赵少陵

中华人民共和国
国家知识产权局局长

2008 年 11 月 5 日

权 利 要 求 书

1. 一种生产促胰岛素分泌肽 GLP-1 (7-36) 的基因工程菌，其特征在于：该基因工程菌携带的质粒中包含有表达 GLP-1 (7-36) 的基因，宿主细胞为大肠杆菌。

2. 根据权利要求 1 所述的基因工程菌，其特征在于：所述质粒中包含有 n 个表达 GLP-1 (7-36) 的基因，其中， n 为从 1 到 32 的整数。

3. 根据权利要求 2 所述的基因工程菌，其特征在于：所述质粒中包含有 16 个表达 GLP-1 (7-36) 的基因。

4. 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的基因工程菌，其特征在于：所述的大肠杆菌是 JM103, JM109 或 $DH_5\alpha$ 。

5. 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的基因工程菌，其特征在于：所述质粒的启动子为 Lac, P_L , Tac, P_{T7} 或 Trp。

6. 一种生产促胰岛素分泌肽 GLP-1 (7-36) 的基因工程菌的构建方法，包括将 n 个表达 GLP-1 (7-36) 的基因克隆于质粒中，并将质粒转化到宿主细胞大肠杆菌中，其中， n 为从 1 到 32 的整数。

7. 根据权利要求 6 所述的构建方法，其特征在于：所述的宿主细胞大肠杆菌是 JM103, JM109 或 $DH_5\alpha$ 。

8. 根据权利要求 6 所述的构建方法，其特征在于：所述的质粒的启动子为 Lac, P_L , Tac, P_{T7} 或 Trp。

9. 一种生产促胰岛素分泌肽 GLP-1 (7-36) 的方法，包括构建权利要求 1 或 2 或 3 或 4 或 5 定义的基因工程菌，然后在液体培养基中进行发酵培养，产生和积累含有 GLP-1 (7-36) 的包涵体，通过细胞破碎和包涵体的分离纯化得到融合蛋白，再经过融合蛋白裂解以及 GLP-1 (7-36) 的纯化得到产品。

说明书

生产促胰岛素分泌肽 GLP-1(7-36)的基因工程菌 以及生产 GLP-1(7-36)的方法

技术领域

本发明涉及生产促胰岛素分泌肽 GLP-1(7-36) (Glucagon Like Peptide, 胰高血糖素类多肽) 的基因工程菌和利用该基因工程菌发酵生产 GLP-1(7-36)的方法。GLP-1(7-36)是可能作为 II 型糖尿病治疗药物的一种活性多肽。

背景技术

GLP-1 是人体分泌的一种肠道激素,由胰高血糖素原(Proglucagon)分子经肠道蛋白水解酶作用而产生,因而称为胰高血糖素类多肽。当血糖浓度高于 6mmol/L 时, GLP-1 能显著促进胰岛素分泌;而一旦血糖浓度恢复至正常值则不再继续作用,这一点对 II 型糖尿病的治疗十分有用(中国专利公开号 CN 1129224A)。

人体内的 GLP-1 有二种形式,一种为 GLP-1(7-36)NH₂, 是由 30 个氨基酸残基组成的多肽,其 C 端是酰胺化了的;另一种为 GLP-1(7-37),是由 31 个氨基酸残基组成的多肽。GLP-1(7-36)NH₂ 和 GLP-1(7-37)有相同的促胰岛素分泌作用,例如实验证明,在 $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-11}$ mol/L 浓度下, GLP-1 对离体胰岛细胞作用时,促进了胰岛素的分泌,故又称它们为促胰岛素分泌肽。

中国专利公开 CN 1129224A 说明书第 32 页报道,与上述二种促胰岛素分泌肽一样, GLP-1(7-36)也具有促胰岛素分泌作用。

已经有报道通过基因工程方法来生产 GLP-1(7-36)NH₂, 但还没有研究者尝试用基因工程技术生产 GLP-1(7-36)。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是构建用于生产 GLP-1(7-36)的一系列基因工程菌株，以及利用这些菌株生产 GLP-1(7-36)的方法。应用本发明提供的基因工程菌以及相应的方法，能够大规模低成本地生产 GLP-1(7-36)。

GLP-1(7-36)的氨基酸序列如下：

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg

式中英文缩写表示：His 组氨酸，Ala 丙氨酸，Glu 谷氨酸，Gly 甘氨酸，Thr 苏氨酸，Phe 苯丙氨酸，Ser 丝氨酸，Asp 天冬氨酸，Val 缬氨酸，Tyr 酪氨酸，Leu 亮氨酸，Gln 谷氨酰胺，Lys 赖氨酸，Trp 色氨酸，Ile 异亮氨酸，Arg 精氨酸

本发明是通过以下技术方案来实现的。

本发明提供的生产促胰岛素分泌肽 GLP-1(7-36)的基因工程菌，该菌属大肠杆菌(*Escherichia coli*)，保藏在北京中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏日期为 2001 年 7 月 11 日，保藏号为 CGMCC No.0599。该基因工程菌携带的质粒中包含有表达 GLP-1(7-36)的基因，宿主细胞为大肠杆菌。

本发明提供的生产促胰岛素分泌肽 GLP-1(7-36)的基因工程菌，其携带的质粒中包含有 n 个表达 GLP-1(7-36)的基因，其中，n 为从 1 到 32 的整数。

本发明提供的生产促胰岛素分泌肽 GLP-1(7-36)的基因工程菌，优选例为：其携带的质粒中包含有 16 个表达 GLP-1(7-36)的基因。

本发明提供的生产促胰岛素分泌肽 GLP-1(7-36)的基因工程菌，

其宿主细胞大肠杆菌为 JM103, JM109 或 DH₅α。

本发明提供的生产促胰岛素分泌肽 GLP-1(7-36)的基因工程菌, 携带的质粒的启动子为 Lac, P_L, Tac, P_{T7} 或 Trp。

本发明的基因工程菌的构建方法, 包括将 n 个表达 GLP-1(7-36) 的基因克隆于质粒中, 并将质粒转化到宿主细胞大肠杆菌中, 其中, n 为从 1 到 32 的整数。

本发明的基因工程菌的构建方法中, 所述的宿主细胞大肠杆菌为 JM103, JM109 或 DH₅α。

本发明的基因工程菌的构建方法中, 所述的质粒的启动子为 Lac, P_L, Tac, P_{T7} 或 Trp。

本发明的生产 GLP-1(7-36)的方法, 包括构建权利要求 1 或 2 或 3 或 4 或 5 定义的基因工程菌, 然后在液体培养基中进行发酵培养, 产生和积累含有 GLP-1(7-36)的包涵体, 通过细胞破碎和包涵体的分离纯化得到融合蛋白, 再经过融合蛋白裂解以及 GLP-1(7-36)的纯化得到产品。

本发明采用如下方法构建基因工程菌株: 将 1 个表达 GLP-1(7-36) 的基因, 或者将 2 到 32 个表达 GLP-1(7-36)的基因串联成聚合体后, 克隆于大肠杆菌质粒中, 启动子可使用 Lac, P_L, Tac, P_{T7} 或者 Trp 等, GLP-1(7-36)是作为该基因工程菌所表达的融合蛋白的一个主要组成部分通过加工来得到的。

基因工程菌的构建对本发明至关重要。根据遗传密码的简并性, 大多数氨基酸可以具有几组不同的密码子。本发明的各种实施方案包括使用各种不同的密码子来构成表达 GLP-1(7-36)的基因。

用本发明提供的基因工程菌, 结合微生物发酵和下游分离纯化技术, 可以大规模地生产促胰岛素分泌肽 GLP-1(7-36), 生产成本大大低于化学合成法生产 GLP-1(7-36), 与现有技术生产 GLP-1(7-36)NH₂ 或 GLP-1(7-37)相比也要低得多。GLP-1(7-36)有可能成为 II 型糖尿

病治疗药物，通过实施本发明，可以为 II 型糖尿病患者大量提供价格低廉的活性多肽 GLP-1(7-36)。

附图说明

现结合附图和实施例对本发明的内容作进一步说明。

图 1 为本发明生产 GLP-1(7-36)的工艺流程图。

图 2 为实施例所得产品 GLP-1(7-36)的 HPLC 图谱。

图 3 为实施例所得产品 GLP-1(7-36)的毛细管电泳图谱。

图 4 为实施例所得产品 GLP-1(7-36)的氨基酸组成分析结果。

图 5 为实施例所得产品 GLP-1(7-36)氨基酸序列分析结果。

图 6 为实施例所得产品 GLP-1(7-36)质谱分析结果。

图 7 为实施例所得产品 GLP-1(7-36)的生物活性试验结果。

具体实施方式

实施例 1:

构建含有 1 个 GLP-1(7-36)基因的菌株，并利用该菌株生产 GLP-1(7-36)

按 GLP-1 (7-36) 的氨基酸序列，合成如下 4 个基因片段：

(1) AAT TCC AGA TCT CGT CAC GCG GAA GGT ACC TTC
ACC AGC GAT GTG AGC AGC TAT CTG

(2) ACC TTC CAG ATA GCT GCT CAC ATC GCT GGT GAA
GGT ACC TTC CGC GTG ACG AGA TCT GG

(3) GAA GGT CAG GCG GCG AAA GAA TTT ATC GCG TGG
CTG GTG AAA GGT CGT GGA TCC TAG A

(4) AG CTT CTA GGA TCC ACG ACC TTT CAC CAG CCA CGC
GAT AAA TTC TTT CGC CGC CTG

然后将 4 个基因片段连接成一个表达 GLP-1 (7-36) 的基因, 基因片段的连接步骤为: 将上述四个基因片段含量各为 $A_{260\text{nm}}=5$, 分别溶于 50 微升重蒸水中, No.1 和 No.2 各取 1 微升置于 1.5 毫升离心管中, No.3 和 No.4 各取 1 微升放于另一个离心管中。两管中各加 1 微升 polynucleotide kinase buffer 1×10 (聚核苷酸激酶缓冲液), 1 微升的 1mM ATP-钠盐以及 1 微升 polynucleotide kinase (聚核苷酸激酶), 37℃保温 1 小时, 水浴加热至 90℃, 维持 5 分钟, 然后使之徐徐冷却至室温, 将两个试管中的内容物混合后加 1mM ATP-钠盐 1 微升, T_4 -DNA ligase buffer 1×10 (T_4 -DNA 连接酶缓冲液), 1 微升, T_4 -DNA ligase (T_4 -DNA 连接酶缓冲液) 1 微升, 混合物于 16℃放置过夜, 1%琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭显色证明连接完成。

取大肠杆菌质粒, 启动子为 Lac, 经过 EcoR I 和 Hind III 双酶解后, 加苯酚-氯仿抽提, 取水层, 再用氯仿洗涤水层 2 次, 加异丙醇 60%沉淀, 室温 1 小时, 离心, 将沉淀中的有机溶剂蒸发除去后, 将上述的连接完成的基因与经过双酶切的质粒溶液混合, 加 1mM ATP-钠盐 1 微升 T_4 DNA ligase buffer 1×10 1 微升 T_4 ligase, 加 T_4 DNA-ligase 1 微升, 18℃过夜。

大肠杆菌受体菌 JM103 (或 JM109, $DH_5\alpha$) 于 50 毫升 LB 培养液, 37℃振荡培养至 $A_{600\text{nm}}$ 达 0.6 时, 离心, 收集菌体, 悬浮于冰冷的 10 毫升 CaCl_2 溶液中 (CaCl_2 , 60mM, 甘油 15%, 10mM PIPES 【哌嗪-N,N'-双[2-乙烷磺酸]】, pH 7.0, 经过灭菌), 再用 3000rpm 离心, 悬浮于 2 毫升 冰冷的上述 CaCl_2 溶液中, 冰浴中保存备用。

取受体细胞 50 微升, 将克隆的质粒取 5 微升, 混合后 42℃维持 2 分钟, 冷却, 加 LB 培养液 100 微升, 37℃, 保温 1 小时, 分别涂琼脂糖板 (含 50 微克/毫升氨苄青霉素 Ap), 37℃培养过夜, 挑取菌落。进一步培养, 抽提质粒, 用 EcoR I/Hind III 双酶切后, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查克隆的基因。

DNA 序列分析:

单个 GLP-1 (7-36) 基因的 DNA 序列分析与设计符合:

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val
CAC	GCG	GAA	GGT	ACC	TTC	ACC	AGC	GAT	GTG
GTG	CGC	CTT	CCA	TGG	AAG	TGG	TCG	CTA	CAC

Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly	Gln	Ala	Ala	Lys
AGC	AGC	TAT	CTG	GAA	GGT	CAG	GCG	GCG	AAA
TCG	TCG	ATA	GAC	CTT	CCA	GTC	CGC	CGC	TTT

Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg
GAA	TTT	ATC	GCG	TGG	CTG	GTG	AAA	GGT	CGT
CTT	AAA	TAG	CGC	ACC	GAC	CAC	TTT	CCA	GCA

用构建好的基因工程菌株, 经过发酵、菌体收集、细胞破碎、包涵体分离纯化、融合蛋白裂解以及 GLP-1(7-36)纯化等步骤, 即可得到纯度达 99%的产品。图 2 和图 3 分别为所得 GLP-1(7-36)的 HPLC 和毛细管电泳图谱。

所得产品经氨基酸组成分析、氨基酸序列分析、质谱分析等测试, 证实应用本发明提供的基因工程菌, 经发酵及下游加工后所得多肽为 GLP-1(7-36)。

图 4 为氨基酸组成分析结果, 所得多肽的氨基酸组成与 GLP-1(7-36)完全相同。

图 5 为所得多肽的氨基酸序列分析结果, 其 N 末端 15 个氨基酸的组成和排列与 GLP-1(7-36)完全相同。

图 6 为质谱分析结果, 测定所得多肽分子量为 3297.12, 在误差

范围内与 GLP-1(7-36)的分子量 3298.68 相符合。

考察所得 GLP-1(7-36)的生物活性,发现其与 GLP-1(7-37)及 GLP-1(7-36)NH₂ 相同,均有促进胰岛素分泌和降低血糖浓度的作用。图 7 为 NOD 小鼠耐糖实验结果。对体重 20 克的 NOD 小鼠分别给葡萄糖,葡萄糖+10 微克 GLP-1(7-36)、葡萄糖+10 微克 GLP-1(7-36)NH₂、葡萄糖+10 微克 GLP-1(7-37),发现只给葡萄糖的小鼠血糖浓度出现很高的峰值,而给药的小鼠血糖浓度均基本保持稳定,不出现血糖高峰。这是由于 GLP-1 促进了胰岛素分泌,从而有效地控制了血糖浓度。实验结果表明, GLP-1(7-36)、GLP-1(7-36)NH₂ 和 GLP-1(7-37)具有相同的促胰岛素分泌作用。

实施例 2

构建含有 16 个 GLP-1(7-36)基因的菌株,并利用该菌株生产 GLP-1(7-36)

将实施例 1 所得质粒溶液取 5 微升,置于 0.5 毫升塑料试管中加 Bgl II 内切酶 buffer 1×10¹ 微升, Bgl II 和 Hind III 1 微升, 37℃, 保温 1 小时,然后取样走 1%琼脂糖凝胶电泳分离 GLP-1(7-36)基因片段,回收后备用。

另取实施例 1 所得质粒溶液 1 微升,加 BamH I buffer 1×10¹ 微升,然后加 BamH I 和 Hind III 各 1 微升, 37℃保温 1 小时,苯酚-氯仿处理,离心分取水层,用氯仿洗涤 2 次,离心分取水层,加 60% 异丙醇溶液沉淀,离心,蒸发,除去沉淀中的有机溶剂,加 10 微升水溶解,与 Bgl II 和 Hind III 双酶解的 GLP-1 基因片段混合,加 T₄ DNA-ligase buffer 1×10¹ 微升, 1mM ATP 钠盐 1 微升及 T₄ DNA-ligase 2 微升, 18℃保温过夜,完成连接。

转化 JMF03,受体菌与上述相同方法制备。涂板在 50μg/ml Ap 条件下, 37℃培养过夜,挑选菌落进行培养。抽取质粒,经 EcoR I/Hind

III 双酶切后，1%琼脂糖凝胶电泳检查筛选含有由两个 GLP-1(7-36)基因组成的二聚体的质粒。

如上重复进行 GLP-1(7-36)基因串联，得到质粒中含有由 16 个 GLP-1(7-36)基因组成的串联基因。按实施例 1 的方法将这一质粒转化到大肠杆菌受体菌 JM103，即构建完成了有 16 个 GLP-1(7-36)串联基因的基因工程菌。

用构建好的基因工程菌株进行发酵，再将菌体收集，经细胞破碎、包涵体分离纯化、融合蛋白裂解和 GLP-1(7-36)的纯化等步骤，即得到纯度达 99%的产品。

所得产品经氨基酸组成分析、氨基酸序列分析、质谱分析等测试，证实本实施例所得多肽为 GLP-1(7-36)。

按照与实施例 1 相同的方法进行活性测定，实验结果表明，本实施例所得 GLP-1(7-36)产品生物活性同实施例 1。

实施例 3

构建含有 32 个 GLP-1(7-36)基因的菌株，并利用该菌株生产 GLP-1(7-36)

实施例 2 中得到的质粒中包含有 16 个 GLP-1(7-36)基因的串联基因，依前面所述方法，将 2 个这样的基因串联起来，即可得到包含 32 个 GLP-1 串联基因的质粒。再将该质粒转化到 JM103 受体菌，即得到 $n=32$ 的基因工程菌。

用构建好的基因工程菌株进行发酵，再将菌体收集，经细胞破碎、包涵体分离纯化、融合蛋白裂解和 GLP-1(7-36)的纯化等步骤，即得到纯度达 99%的产品。

所得产品经氨基酸组成分析、氨基酸序列分析、质谱分析等测试，证实本实施例所得多肽为 GLP-1(7-36)。

按照与实施例 1 相同的方法进行活性测定，实验结果表明，本实

施例所得 GLP-1(7-36)产品生物活性同实施例 1。

说明书附图

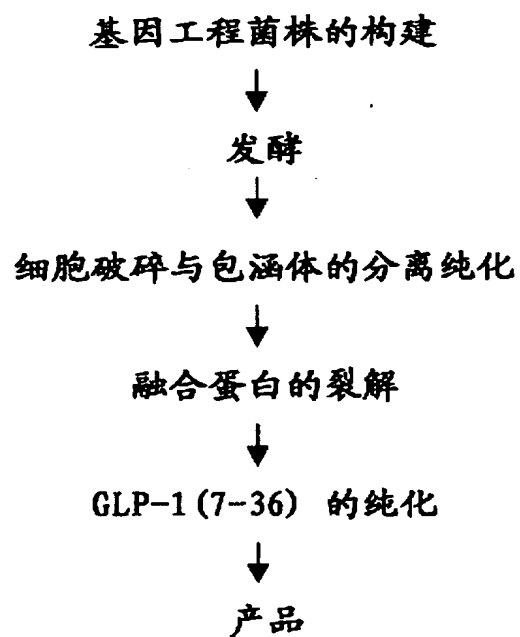


图 1

01.07.24

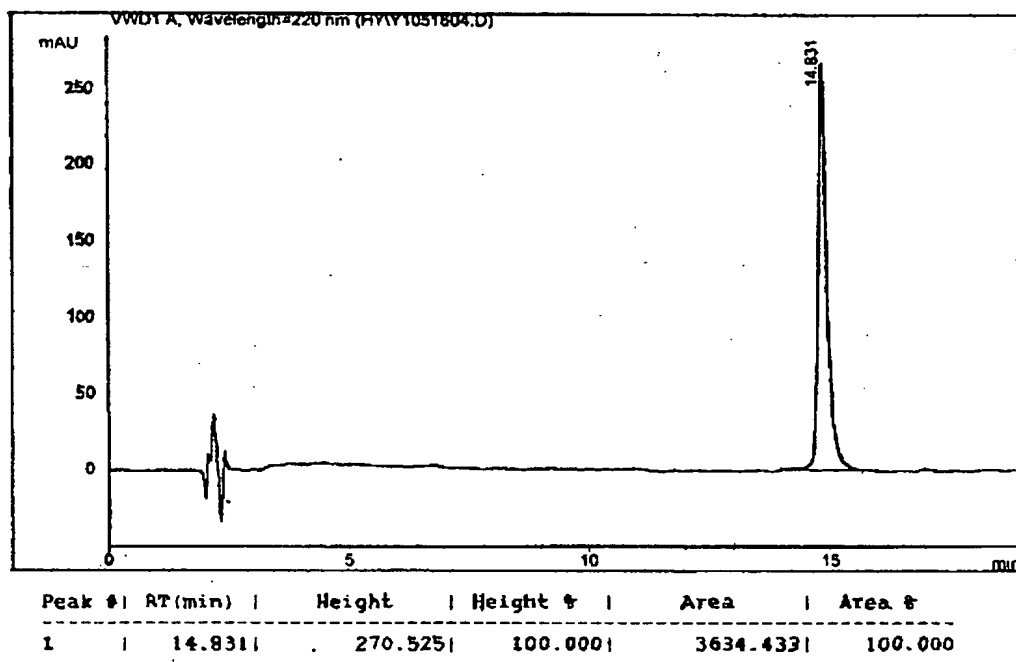
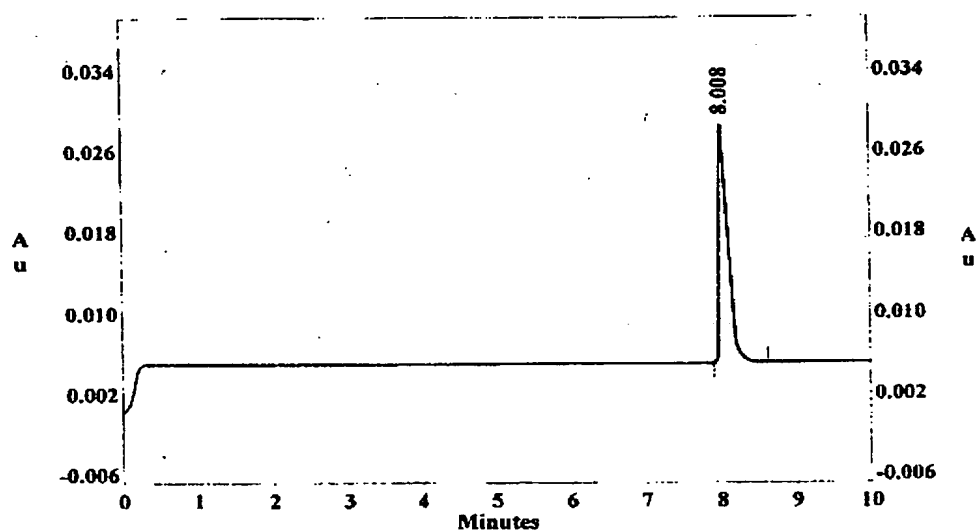


图 2

01.07.24

2/16



Channel A Results

Peak	P.Name	Time	Area	Area %	Rel M.T	Effi
1	GLP-1	8.01	191976	100.000	0.00	

图 3

AD17

实测值 理论值

AA	umol/ml	standard1	standard2	f	umol/ml	umol/ml	ASP	GLU	SER	GLY	HIS	ARG	THR	ALA	PRO	TYR	VAL	Met	CYS	ILE	LEU	NLE	PIHE	LYS
ASP	1.262	494880	550385	0.66262	397190	371001	336258	0.69172	1	ASP	1													
GLU	1.53	484979	540078	0.80761	1284589	1204720	1046211	2.20035	4	GLU	4													
SER	2.5	706508	794452	1.327028	894195	838720	762088	1.54590	3	SER	3													
GLY	2.5	925846	1031086	1.730712	1090537	1017152	922763	1.43950	3	GLY	3													
HIS	2.5	839927	947554	1.580177	390603	358831	328458	0.56076	1	HIS	1													
ARG	2.5	776946	872754	1.458581	383719	357847	326426	0.60204	1	ARG	1													
THR	2.5	723374	810840	1.35657	620565	573089	537854	1.05059	2	THR	2													
ALA	2.5	795635	897032	1.496389	1431080	1338788	1152112	2.15194	4	ALA	4													
PRO	2.5	973169	1091622	1.825669				0.00000	0	PRO	0													
TYR	2.5	998194	1133800	1.884311	393160	369631	330419	0.47685	1	TYR	1													
VAL	2.5	976327	1105508	1.840169	787444	722761	611498	0.96047	2	VAL	2													
Met	2.5	942806	1067211	1.776706				0.00000	0	Met	0													
CYS	2.5	420909	478853	0.795191				0.00000	0	CYS	0													
ILE	2.5	996621	1130700	1.880253	404321	378597	336607	0.48928	1	ILE	1													
LEU	2.5	975516	1108565	1.841936	862110	789104	781561	1.08793	2	LEU	2													
NLE		528511	603107	1	1068186	1036300	934742	0.00000	0	NLE	0													
PIHE	2.5	1005362	1147354	1.90233	776275	729651	637449	0.92552	2	PIHE	2													
LYS	2.5	1870193	2134643	3.539009	1451777	1354803	1239821	0.91019	2	LYS	2													

图 4

氨基酸序列分析鉴定书

上海华谊生物技术公司样品 (IST11) N 末端氨基酸序列
测定结果如下:

No.	残基
1	His
2	Ala
3	Glu
4	Gly
5	Thr
6	Phe
7	Thr
8	Ser
9	Asp
10	Val
11	Ser
12	Ser
13	Tyr
14	Leu
15	Glu

上样程序: PVDF

测序仪: ABI Procise 491

测序者: 沈为群 赵进东 (北京大学生命科学学院)



图 5

01.07.24

19

质谱分析

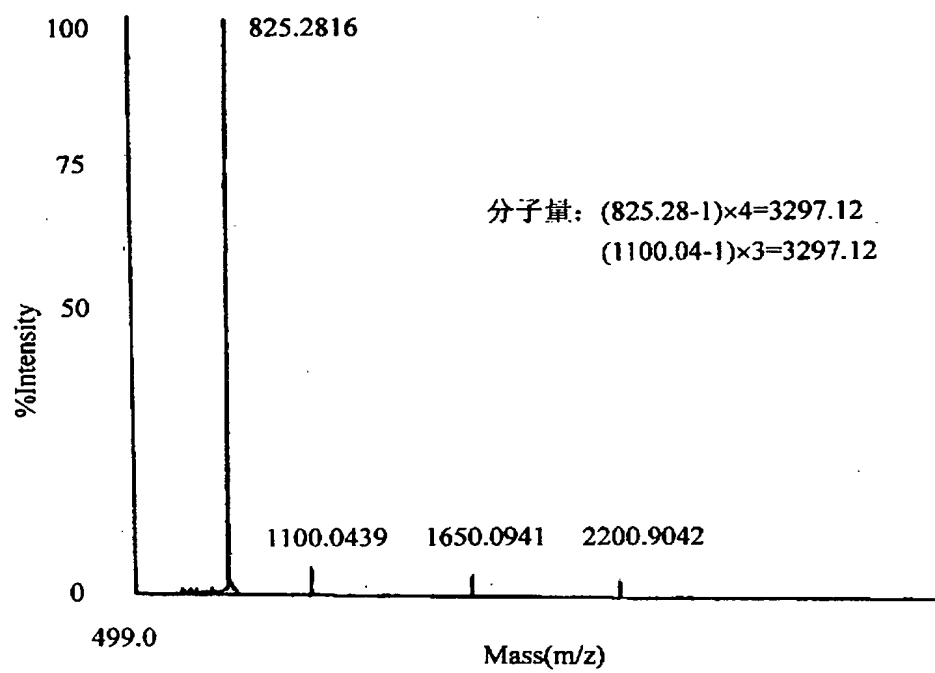
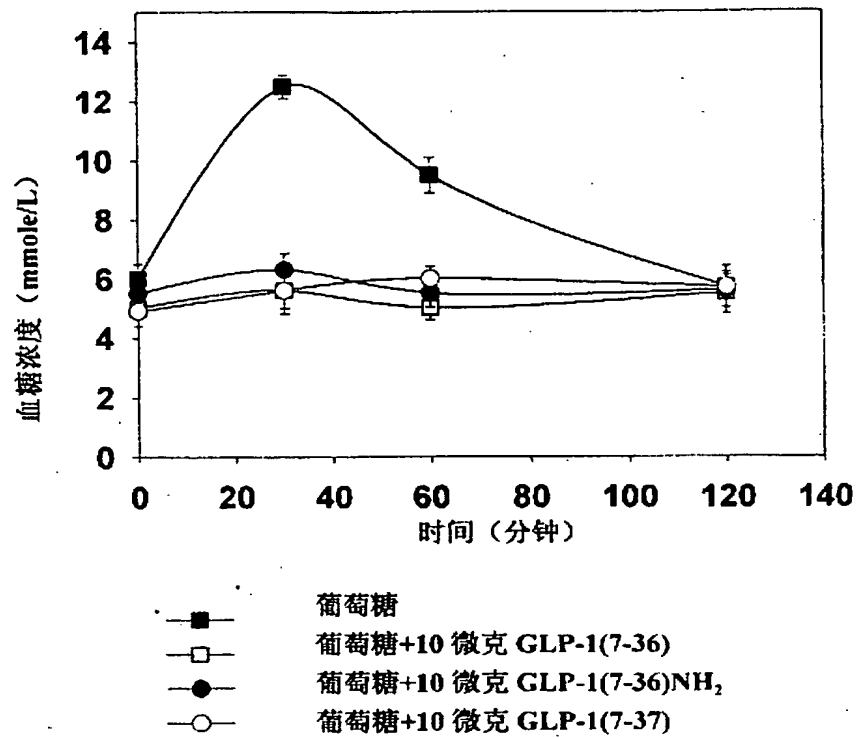


图 6

01.07.24

20



实验条件: NOD 小鼠体重 20 克, 腹腔注射 200 微升 40%葡萄糖

每个数据点样本数目均为 6

图 7